马尾松*HDR*基因克隆及其对旱与盐胁迫的响应

王嘉雯，姚圣，苏欢，刘可欣，朱沛煌，季孔庶*

（南京林业大学林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室 南方现代林业协同创新中心，南京 210037）

摘　要：干旱和土地盐渍化是制约林业可持续发展的重要因素，植物在遭受生物或非生物胁迫时，会在叶片释放萜类等挥发性物质。1-羟基-2-甲基-2-E-丁烯基-4-焦磷酸还原酶（HDR）是 MEP 途径的末端活性酶，具有提供前体萜类物质和主要限速作用。为探究马尾松 *HDR* 基因是否参与干旱和盐胁迫条件下的胁迫响应，该研究克隆了马尾松 *HDR* 基因开放阅读框，并初步分析了其生物信息、组织特异性表达水平和功能。结果表明：（1）*PmHDR* 基因编码区长度为 1 458 bp，编码 485 个氨基酸，其编码蛋白包含 LytB/IspH 基因超家族的核心序列和 PLN02821 多功能结构域，属于 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶家族。（2）*PmHDR* 密码子使用偏好性较弱，偏好使用 A/U 结尾的密码子，烟草、拟南芥与酿酒酵母更适合作为其异源表达受体。（3）qRT-PCR 结果显示，*PmHDR* 基因在马尾松老叶中表达量最高，其次为幼叶、幼茎和老茎，在根中表达量最低。（4）构建基因表达载体 pBI121-PmHDR 并转化拟南芥，转基因拟南芥对干旱和盐胁迫表现出更强的抗逆性。以上研究结果表明 *PmHDR* 参与植物干旱和盐胁迫的响应和调节，该结果可为马尾松抗逆育种提供一定的理论支持。

关键词：马尾松，*PmHDR*，萜类化合物，基因克隆，胁迫响应

中图分类号：Q943　　　　　　　　　　　　　　**文献标识码：**A

Cloning of *HDR* gene in *Pinus massoniana* and its response to drought and salt stress

WANG Jiawen, YAO Sheng, SU Huan, LIU Kexin, ZHU Peihuang, JI Kongshu*

(*Key Laboratory of Forest Genetics & Biotechnology of the Ministry of Education, Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University,* Nanjing 210037, China)

Abstract: Drought and land salinization are inhibiting factors for the sustainable development of forestry, and the plants will release volatile substances such as terpenoids during life or non-biological stress. In order to investigate whether *HDR* gene of *Pinus massoniana* is involved in stress response under drought and salt stress, the open reading frame of *PmHDR* gene was cloned, and bioinformation, tissue specific expression and preliminary function were analyzed. The results were as follows: (1) The coding region of *PmHDR* gene is 1 458 bp, encoding 485 amino acids, and its encoded protein contains the core sequence of LytB/IspH gene superfamily and PLN02821 multifunctional structural domain, which belongs to the 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-pyrophosphate reductase family. (2) The *PmHDR* codon use preference was weak, with a preference for codons ending in A/U. *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* were more suitable as its heterologous expression receptors. (3) qRT-PCR showed that the *PmHDR* gene was most highly expressed in old needles of *Pinus massoniana*, followed by young needles, young stems and old stems and least expressed in roots. (4) The gene expression vector *pBI121-PmHDR* was constructed and transformed into *Arabidopsis thaliana*. The transgenic *A. thaliana* showed greater resistance to drought and salt stress. These results indicate that *PmHDR* is involved in plant response and regulation to drought and salt stress, and these results can provide some theoretical support for

基金项目：国家“十四五”重点研发计划课题（2022YFD2200202），江苏高校优势学科建设工程资助项目（PAPD）。
第一作者：王嘉雯（2000-），本科生，研究方向为林业生物技术，（E-mail）wang_jiawen2276@163.com。
*__通信作者：__季孔庶，博士，教授，研究方向为林木遗传育种、园林植物遗传育种，（E-mail）ksji@njfu.edu.cn。

Pinus massoniana stress-resistance breeding.

Key words: *Pinus massoniana*, *PmHDR*, terpenoids, gene cloning, stress response

马尾松（*Pinus massoniana*）为松科松属高大乔木，是我国古老的本土针叶树种，也是我国特有的速生树种之一，广泛分布于秦岭—淮河以南，云贵高原以东 17 个省、自治区、直辖市，为我国分布面积最广的针叶林树种（李爱民等，2008）。随着全球气候变暖，水资源短缺问题日益严重，大范围持续性干旱和土地盐渍化对我国的农林生产造成了严重威胁，使植物生长受限，并使植物体内的有机物成分发生改变，影响其价值与产量（Pichler & Oberhuber, 2007；张金凤等，2021），对我国的农林生产造成了严重威胁，因此提高树木对干旱和盐胁迫的抗性一直是森林培育的主要目标之一。马尾松作为我国重要的木材、采脂树种和荒山造林先锋树种之一（徐向华和丁贵杰，2006），具有较强的抗逆性，但重度干旱胁迫仍显著抑制马尾松苗高和生物量的增长，严重影响马尾松的生长和繁殖（全文选和丁贵杰，2017），因此研究马尾松对干旱和盐胁迫的适应机制至关重要。

植物在遭受生物或非生物胁迫时，会在叶片释放挥发性物质，包括萜烯类和脂肪酸衍生物等，这些物质具有直接和间接的信号调控作用（Laothawornkitkul et al.，2008），能够及时激活脱落酸（ABA）、茉莉酸甲酯（MeJA）、油菜素内酯（BR）等植物激素的合成和信号转导通路，调节相关基因表达，以缓解或适应胁迫环境（阎秀峰等，2007；Obata & Fernie, 2012）。其中萜类化合物响应干旱胁迫的程度较高，在植物抵抗逆境胁迫的过程中起到重要作用（Rastogi et al.，2019）。萜类化合物是植物次生代谢产物中最丰富、结构最多样化的一类（罗永明等，2003），其以异戊二烯为基本单位，共同前体物为异戊烯焦磷酸（IPP）和其异构体二甲烯焦磷酸（DMAPP）。IPP 和 DMAPP 在生物体内的合成主要有甲羟戊酸途径（MVA pathway）和丙酮酸途径（MEP pathway）两种途径（陈晓明，2018）。其中 MVA 途径主要参与倍半萜的合成，MEP 途径主要参与单萜、二萜和类胡萝卜素等的合成（Rohmer，1999）。1-羟基-2-甲基-2-E-丁烯基-4-焦磷酸还原酶（HDR）是 MEP 途径的末端活性酶，催化 1-羟基-2-甲基-2-E-丁烯基-4-焦磷酸（HMBPP）发生还原反应并以 5:1 的比例生成 IPP 与 DMAPP 的混合物，具有提供前体萜类物质和主要限速作用（王颖等，2014）。

早期发现在大肠杆菌中，*HDR* 基因对 MEP 途径有限制性作用（Cunningham et al.，2000）；在番茄（*Lycopersicon esculentum*）果实成熟和拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）幼苗脱硫这两个大量产生类胡萝卜素的过程中，*HDR* 转录水平明显增加，说明 *HDR* 表达与类胡萝卜素的积累有关（Botella-Pavía et al.，2010）；对银杏（*Ginkgo biloba*）的研究显示，转入 *HDR* 基因的银杏与野生型银杏相比，总内酯含量显著提高（张雯等，2008）；对萝芙木（*Rauvolfia verticillata*）的研究发现，MeJA、乙酰水杨酸（ASA）、ABA、紫外光（UV）等激发子可以诱导上调 *HDR* 基因的转录水平（Chen et al.，2010）；在铁皮石斛（*Dendrobium officinale*）中，*HDR* 基因的表达受水杨酸（SA）和 ABA 的调控，但不受 MeJA 影响（吴秋菊等，2015）。这些已有的研究均表明 *HDR* 基因在 MEP 途径中具有重要的限制调控作用，与植物类胡萝卜素、内酯等萜类化合物的合成密切相关，且受调控非生物胁迫响应的 ABA、SA 等植物激素诱导，说明其可能参与植物对非生物胁迫的响应。

在马尾松中，MEP 途径上游关键酶 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶的编码基因 *PmDXS* 和 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶的编码基因 *PmDXR* 已被成功克隆，并进行了功能和表达分析。DXR 是 MEP 途径的第一个关键酶，对 *PmDXS* 基因的研究结果显示，用机械损伤、15%渗透剂、H_2O_2、乙烯利、MeJA、SA 等 6 种非生物胁迫或激素处理马尾松后，*PmDXS* 基因的表达量在短时间内均有所上调；同时，在 400 mmol·L^{-1} NaCl、800 mmol·L^{-1} D-甘露醇（D-mannitol）、pH 5.0、pH 9.0 等非生物胁迫环境下，TransB/pET28a-*PmDXS* 重组菌生长状况显著优于对照，表明 *PmDXS* 基因在干旱和盐胁迫中具有正调控效应（李荣，2021）。这些结果均说明 *PmDXS* 基因参与非生物胁迫应答，在马尾松的逆境胁迫响应中起一定作用。DXR 是催化 MEP 途径第二步反应的关键限速酶，对 *PmDXR* 基因的研究结果显示，相比于野生型拟南芥，*PmDXR* 转基因拟南芥的生长发育在不同浓度 NaCl、SA、MeJA、D-Mannitol 的胁迫条件下受到的抑制较小（朱灵芝，2021），说明 *PmDXR* 基因也在一定程度上参与马尾松逆境胁迫响应。因此，作

为 MEP 途径的末端限速酶 HDR 的编码基因，*PmHDR* 极有可能参与马尾松在干旱和盐等非生物胁迫的响应过程。本文将克隆马尾松 *PmHDR* 基因序列，对其进行生物信息学分析和组织特异性表达分析，并构建基因表达载体转化拟南芥，对比分析转基因拟南芥和野生型在干旱和盐胁迫条件下的生长情况，拟探讨以下问题：（1）PmHDR 蛋白理化性质、结构、所属基因家族及物种间的进化关系；（2）*PmHDR* 基因的组织特异性表达模式；（3）*PmHDR* 是否参与干旱和盐胁迫等非生物胁迫环境下的胁迫响应。以期为进一步阐明马尾松萜类化合物形成过程关键酶基因的潜在生物学功能提供帮助，并为马尾松抗逆育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

2 年生马尾松实生苗和拟南芥种子，均取自林木遗传与生物技术教育部重点实验室（南京林业大学）。

大肠杆菌 *Trelief*™ 5α感受态细胞和 pClone007 Blunt 载体购自北京擎科生物科技有限公司；根癌农杆菌 GV3101 感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司；Plant Total RNA Isolation Kit、Gel DNA Extraction Mini Kit、Plant DNA Isolation、ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix、ClonExpress II One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；BamH I、Sac I、QuickCut Buffer 购自 Takara；PCR Master Mix、1st Strand cDNA Synthesis SuperMix 购自翌圣生物科技（上海）股份有限公司；DNA ladder、Loading buffer For Agarose Gels 和 TAE Buffer 购自上海捷瑞生物工程有限公司。

试验中引物合成和序列测序由南京擎科生物科技有限公司和上海杰李生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 *PmHDR* 基因的克隆 参照南京诺唯赞 FastPure® Plant Total RNA Isolation Kit 的说明书提取 2 年生马尾松总 RNA，使用 Nanodrop One 超微量紫外分光光度仪检测 RNA 的浓度和纯度，并通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。选取纯度高且完整性较好的 RNA，利用反转录试剂盒 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 将 RNA 反转录为 cDNA，于-20 ℃条件下保存备用。

根据火炬松（*Pinus taeda*）同源基因序列，使用 DNAMAN 软件设计 *PmHDR* 特异性引物，分别为 *PmHDR*-F（5′-ATGCCTTCGAGCCTCAGCTTTGC-3′）、*PmHDR*-R（5′-TACCGTCTGCAACGCCTCCTCAT-3′）。以逆转录获得的马尾松 cDNA 第一链为模板进行 PCR 反应，扩增体系总体积为 50 μL，包括高保真酶 20 μL，上游和下游引物各 1 μL，cDNA 2.5 μL，ddH_2O 25.5 μL。PCR 反应程序为 95 ℃预变性 3 min；95 ℃变性 15 s，60 ℃退火 45 s，72 ℃延伸 1 min，共 35 个循环；72 ℃延伸 5 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后，使用 Gel DNA Extraction 产物回收试剂盒进行回收纯化，实施连接克隆载体（pClone007）并转化至大肠杆菌 *Trelief*™ 5α感受态细胞中，培养单菌落，通过菌落 PCR 筛选阳性克隆送至南京擎科生物科技有限公司测序。

1.2.2 *PmHDR* 基因的生物信息学分析 利用在线软件对 *PmHDR* 基因及其编码蛋白进行生物信息学分析，具体网址见表 1；利用 DNAMAN 软件对 *PmHDR* 蛋白进行同源性比对；运用 MEGA 7.0 的邻接法构建系统发育进化树。

表 1 生物信息学分析在线软件及网址

Table 1 Websites of bioinformatics prediction

在线软件 Online software	网址 Website	用途 Applications
BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	序列比对 Sequence alignment
ExPASy-ProtParam	https://web.expasy.org/protparam	理化性质分析 Physicochemical property analysis
ExPasy-ProtScale	https://web.expasy.org/protscale	亲疏水性分析 Hydrophilic analysis
NCBI-CD	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi	保守结构域分析 Conservative domain analysis

在线软件 Online software	网址 Website	用途 Applications
Cell-PLoc2.0	http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2	亚细胞定位预测 Prediction of subcellular localization
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/ npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html	二级结构预测 Secondary structure prediction
Phyre2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2	三级结构预测 Tertiary structure prediction
TMHMM 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM	跨膜结构分析 Transmembrane structure analysis
SignalP 5.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-5.0	信号肽分析 Signal peptide analysis
NetPhos 3.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos	磷酸化位点分析 Phosphorylation site analysis
YinOYang 1.2	http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang	O-糖基化位点分析 O-glycosylation site analysis
NetNGlyc 1.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc	N-糖基化位点分析 N-glycosylation site analysis

1.2.3 *PmHDR* 同义密码子偏好性分析 利用 CodonW 1.4.2 软件计算 *PmHDR* 密码子的使用特性参数，包括 A3s、U3s、C3s、G3s、相对同义密码子使用度（relative synonymous codon usage, RSCU）、有效密码子数（effective number of codons, ENC）、密码子适应系数（codon adaptation index, CAI）、最优密码子使用频率（frequency of optimal codons, FOP）、GC 含量和密码子第 3 位上的 GC 含量（GC3s）等。运用 EMBOSS 中的 CUSP 在线软件计算密码子的使用频率。

拟南芥、烟草（*Nicotiana tabacum*）、大肠杆菌（*Escherichia coli*）和酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的基因组密码子使用频率数据来自密码子使用统计数据库（http://www. kazusa.or.jp/codon）。

1.2.4 *PmHDR* 基因的表达分析 剪取 2 年生马尾松根、幼叶、老叶、幼茎、老茎等五个部位的样品，分别使用液氮研磨，提取各样品总 RNA，通过琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop One 超微量紫外分光光度仪检测各 RNA 的浓度和质量，将符合要求的 RNA 反转录成 cDNA。使用 Nanodrop One 测定 cDNA 浓度，并将各 cDNA 稀释至 10 ng·μL^{-1}。

根据克隆所得 *PmHDR* 基因序列，使用 Primier 5.0 软件设计实时荧光定量 PCR（qPCR）引物 q-PmHDR-F（5′-AGAAATCGCAGAGCAGAA-3′）和 q-PmHDR-R（5′-CAACGCCTCCTCATCCTT-3′），以 *TUA*（GenBank：KM496535.1）为内参基因，用 SYBR Green 进行实时荧光定量表达分析。反应体系共 10 μL，包括 cDNA 模板 1 μL，上下游引物各 0.2 μL，SYBR Green Real-time PCR Master Mix (2×)5 μL，无菌水 3.6 μL。qPCR 反应在 ABI StepOne Plus 荧光定量 PCR 仪上进行，反应程序使用两步法：95 ℃预变性 30 s；95 ℃变性 5 s，60 ℃退火延伸 30 s，40 次循环，分别设置 3 次生物学重复和 3 次技术重复，PCR 反应结束后进行熔解曲线分析。使用 SPSS 26 软件进行数据分析并作图，采用邓肯多重比较法分析各组织表达量差异显著性。

1.2.5 基因表达载体构建 使用 pBI121-GUS 质粒作为真核表达载体，根据测序得到的 *PmHDR* 基因序列，选择 BamH I 和 Sac I 两个酶切位点，设计去除终止密码子且含有酶切位点序列的重组引物 PmHDR-BamHI-F（5′-ACGGGGGACTCTAGAGGATCCATGCCTTCGAGCCTCAGCTT-3′）和 PmHDR-SacI-R（5′-CGATCGGGGAAATTCGAGCTCCCGTCTGCAACGCCTCCT-3′）。以马尾松 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增，通过琼脂糖凝胶电泳检测产物质量和大小，并切胶回收得到含酶切位点的 *PmHDR* 基因 ORF 片段。

用限制性核酸内切酶 BamH I和 Sac I 对 pBI121-GUS 质粒进行双酶切，将酶切后的质粒切胶回收后，与 *PmHDR* 基因片段连接，并立即转化 *Trelief*™ 5α大肠杆菌，于含卡那霉素的 LB 固体培养基上培养过夜，挑取单菌落进行 PCR 阳性检测，将阳性单克隆扩繁后送至南京擎科生物科技有限公司进行测序，并由其返还重组载体质粒 pBI121-*PmHDR*。

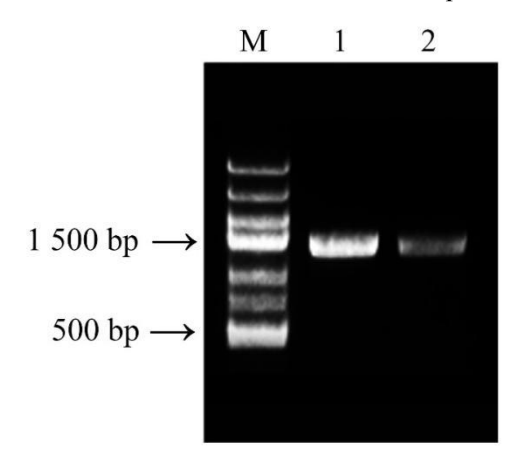
1.2.6 遗传转化拟南芥及胁迫处理 用重组质粒冻融法转化农杆菌，扩大培养阳性单菌落，花序侵染法转化拟南芥。收取拟南芥种子，依次用 75%乙醇和 20%次氯酸钠消毒，均匀播种在含有 50 mg·mL^{-1} Kan 抗生素的 MS 固体培养基上进行抗性筛选，将其中长势良好的拟南芥幼苗移栽至营养土中继续培养。分别采集野生型和转基因拟南芥的叶片，液氮研磨，使用南京诺唯赞生物科技股份有限公司生产的 FastPure® Plant DNA Isolation 提取基因组 DNA，并以其为模板，用 PmHDR-BamHI-F 和 PmHDR-SacI-R 做引物，进行 PCR 扩增，筛选出 *PmHDR* 转基因拟南芥。重复筛选 1 次，采集拟南芥种子。

分别配制含 50 mmol·L^{-1} NaCl 和含 5 、10、50、100 mmol·L^{-1} D-甘露醇的 MS 固体培养基，将野生型和转基因拟南芥消毒后分别点播在培养基上，每个培养基播种 20 个种子。培养 10 d 后，观察拟南芥发芽及生长状况，从每个培养基中挑选 10 个成功发芽的拟南芥，测量并记录其胚根长，使用 RStudio 软件对根长数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 *PmHDR* 基因的克隆及序列比对

扩增获得 *PmHDR* 基因中间片段序列，长度为 1 458 bp，与琼脂糖凝胶电泳结果相符（图 1）。



M 代表 DNA Marker，1 和 2 代表 *PmHDR* 基因。

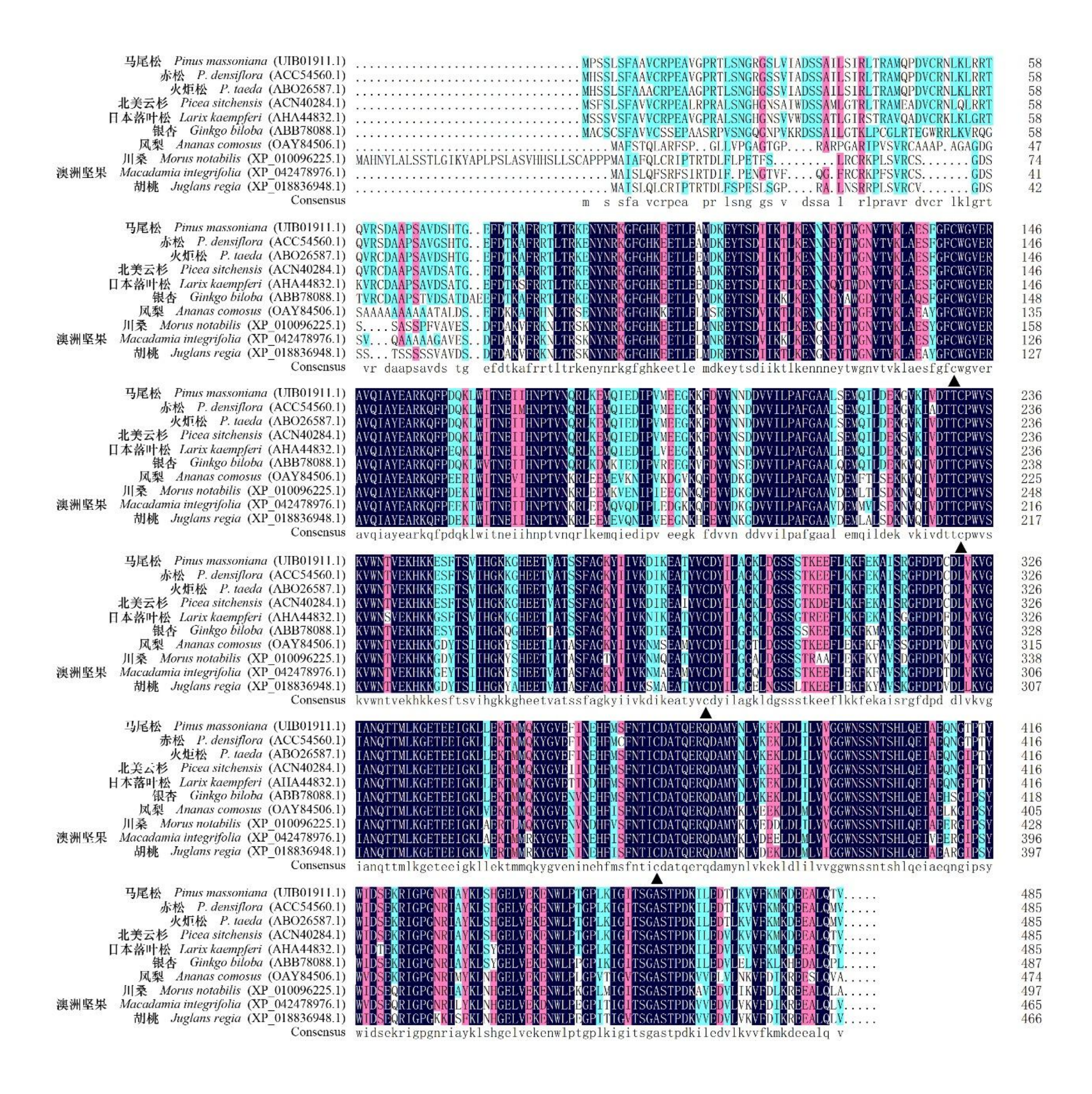
M represents DNA Marker, 1 and 2 represent *PmHDR* gene.

图 1 *PmHDR* 中间片段电泳检测结果

Fig.1 Electrophoresis results of intermediate fragment of *PmHDR*

通过 NCBI 的 Blastn 在线软件，将 *PmHDR* 基因序列与其他物种进行比对。输出结果显示，共有 5 种植物基因序列与 *PmHDR* 相似度高于 85%，分别为赤松（*Pinus densiflora*）、火炬松（*P. taeda*）、白云杉（*Picea glauca*）、北美云杉（*P. sitchensis*）和日本落叶松（*Larix kaempferi*），其中赤松和火炬松的 *IDS1* 基因与 *PmHDR* 基因序列相似度高达 98%以上。

通过 NCBI 的 Blastp 在线软件对 *PmHDR* 的氨基酸序列进行比对，结果显示，*PmHDR* 与赤松、火炬松的氨基酸序列相似度最高，达到 97%以上，与北美云杉、日本落叶松、银杏、川桑（*Morus notabilis*）、澳洲坚果（*Macadamia integrifolia*）、胡桃（*Juglans regia*）、凤梨（*Ananas comosus*）等物种的相似度也均高于 78%，说明 *HDR* 基因在进化过程中较为保守。选取与 *PmHDR* 氨基酸序列相似度较高的几个物种，通过 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对（图 2），发现 *PmHDR* 的氨基酸序列与其他物种一致，均含有 4 个保守的半胱氨酸残基活性位点，这些活性位点可能参与催化过程中铁硫键的形成（Lu et al., 2008）。



深蓝色区域代表几个物种的氨基酸序列完全一致，粉色区域代表氨基酸序列高度保守，浅蓝色与白色区域代表氨基酸序列差异较大。▲代表半胱氨酸残基保守位点。

The dark blue regions represent complete amino acid sequence identity for several species, the pink regions represent highly conserved amino acid sequences, and the light blue and white regions represent highly divergent amino acid sequences. ▲ represents conserved cysteine residues.

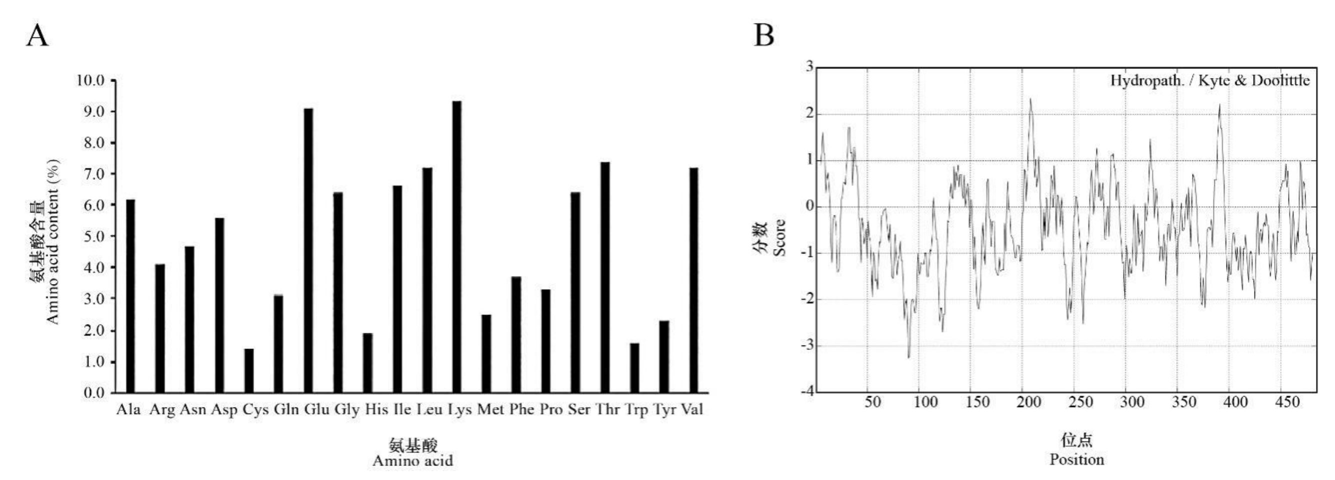
图 2 *PmHDR* 氨基酸序列与其他物种的同源性比对

Fig.2 Amino acid homology alignment of *HDR* gene from *Pinus massoniana* and other species

2.2 *PmHDR* 的生物信息学分析

2.2.1 蛋白一级结构及理化性质分析

PmHDR 编码蛋白质的分子式为 $C_{2415}H_{3844}N_{654}O_{744}S_{19}$，理论分子质量为 54.55 kD，理论等电点为 5.98，由 485 个氨基酸组成，共包含 71 个负电荷氨基酸碱基和 65 个正电荷氨基酸碱基。该蛋白中含量最多的氨基酸为赖氨酸，占总氨基酸的 9.3%；含量最少的为半胱氨酸，仅占 1.4%（图 3：A）。蛋白脂肪系数为 80.99，总平均亲水性为-0.447，说明该蛋白是亲水性蛋白（图 3：B）；不稳定系数为 28.98，说明该蛋白为稳定蛋白。



A. *PmHDR* 编码蛋白的氨基酸组成；**B**. *PmHDR* 编码蛋白的亲疏水性预测。

A. Amino acid compositions of protein encoded by *PmHDR*; **B**. Hydrophilicity and hydrophobicity analysis of protein encoded by *PmHDR*.

图 3 *PmHDR* 基因编码蛋白质的理化性质分析

Fig.3 Amino acid compositions of protein encoded by *PmHDR*

2.2.2 保守结构域的预测与分析

PmHDR 的氨基酸序列保守结构域预测结果显示，*PmHDR* 基因编码蛋白在第 60 至第 483 个氨基酸残基处具有 PLN02821 多功能结构域，该结构域属于 *LytB/IspH* 基因超家族（Accession：cl19123），该家族成员可将 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸（HMBPP）转化为异戊烯焦磷酸（IPP）和二甲烯焦磷酸（DMAPP），由此可预测 *PmHDR* 基因编码蛋白质具有还原 HMBPP 的功能（图 4：A）。

2.2.3 亚细胞定位预测

使用在线软件 Cell-PLoc2.0 和 IncLocator 对 *PmHDR* 的亚细胞定位进行预测，结果均显示 *PmHDR* 编码蛋白位于叶绿体中的可靠性较高。

2.2.4 蛋白质跨膜结构及信号肽分析

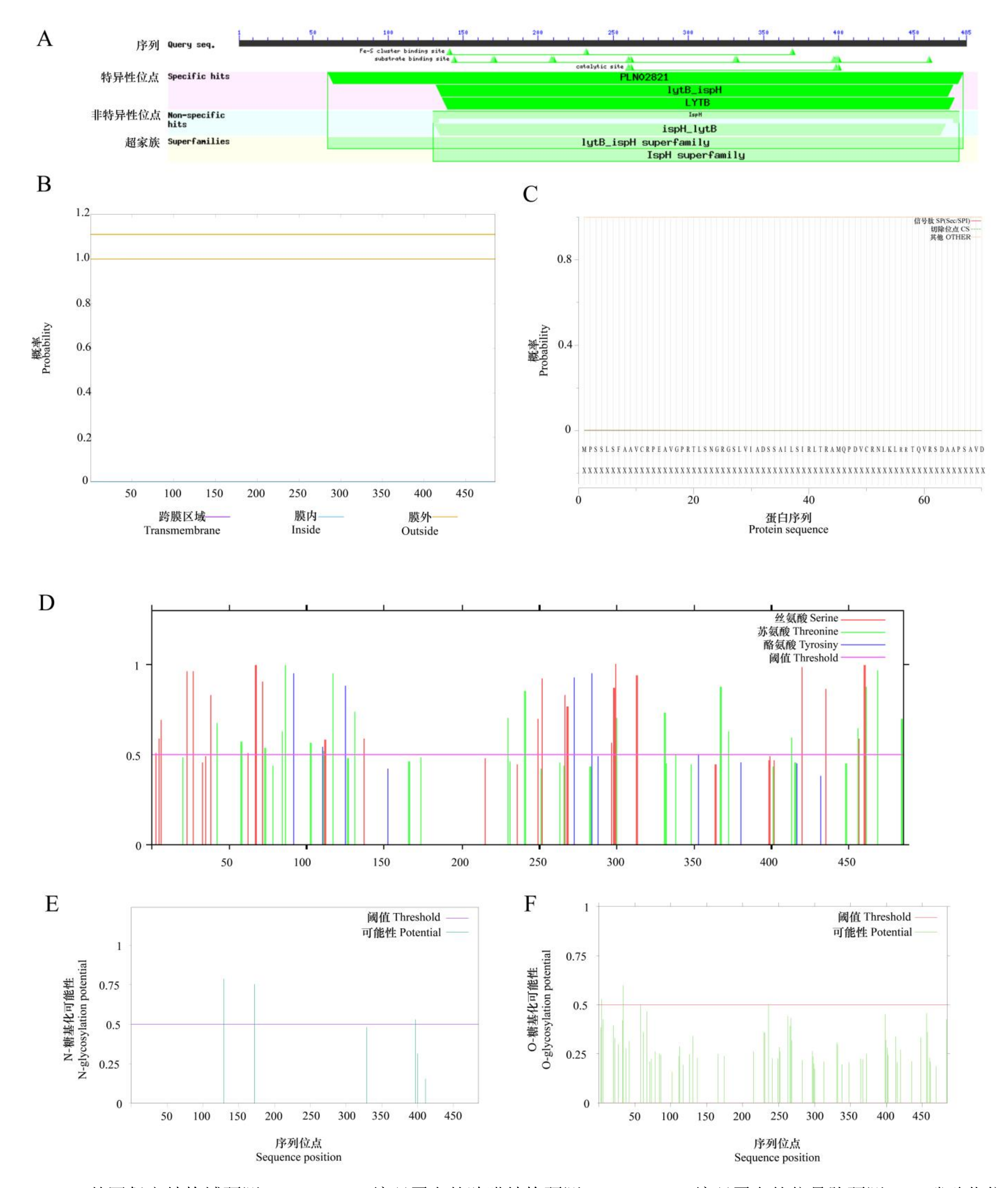
利用在线软件 TMHMM Server v.2.0 对 *PmHDR* 编码蛋白质的跨膜结构及跨膜方向进行预测分析，结果显示该蛋白不存在跨膜结构，全部位于膜外（图 4：B）。

使用在线工具 SignalP-5.0 Server 对 *PmHDR* 编码蛋白进行信号肽预测分析，结果显示其不含有信号肽，表明其为非分泌蛋白（图 4：C）。

2.2.5 蛋白质磷酸化位点和糖基化位点分析

使用 NetPhos 3.1 Server 在线软件进行磷酸化位点的预测分析，结果显示 *PmHDR* 编码蛋白中共有 47 个磷酸化位点，包括 23 个丝氨酸（S），20 个苏氨酸（T），4 个酪氨酸（Y）（图 4：D）。

分别使用 YinOYang 1.2 和 NetNGlyc 1.0 Server 在线软件进行 O-糖基化和 N-糖基化进行预测分析，结果显示 *PmHDR* 编码蛋白中共有 4 个 O-糖基化位点，分别为第 4（S）、34（S）、58（T）、236（S）个氨基酸（图 4：E）；共有 3 个 N-糖基化位点，分别为第 129、第 172、第 397 个氨基酸（图 4：F）。



A. *PmHDR* 基因保守结构域预测；**B**. *PmHDR* 编码蛋白的跨膜结构预测；**C**. *PmHDR* 编码蛋白的信号肽预测；**D**. 磷酸化位点预测；**E**. O-糖基化位点预测；**F**. N-糖基化位点预测。

A. Prediction of conservative protein sequences encoded by *PmHDR*; **B**. Prediction of protein transmembrane region encoded by *PmHDR*; **C**. Prediction of protein transmembrane region encoded by *PmHDR*; **D**. Prediction of phosphorylation sites; **E**. Prediction of O-glycosylation sites; **F**. Prediction of N-glycosylation sites.

图 4 *PmHDR* 编码蛋白的生物信息学分析

Fig.4 Bioinformatics analysis of protein encoded by *PmHDR*

2.2.6 蛋白二级结构分析

PmHDR 基因编码蛋白的二级结构预测结果显示该蛋白中含有α螺旋 211 个，占比 43.51%；含有无规则卷曲 164 个，占比 33.81%；含有延伸链 78 个，占比 16.08%；含有β转角 32 个，占比 6.60%（图 5）。

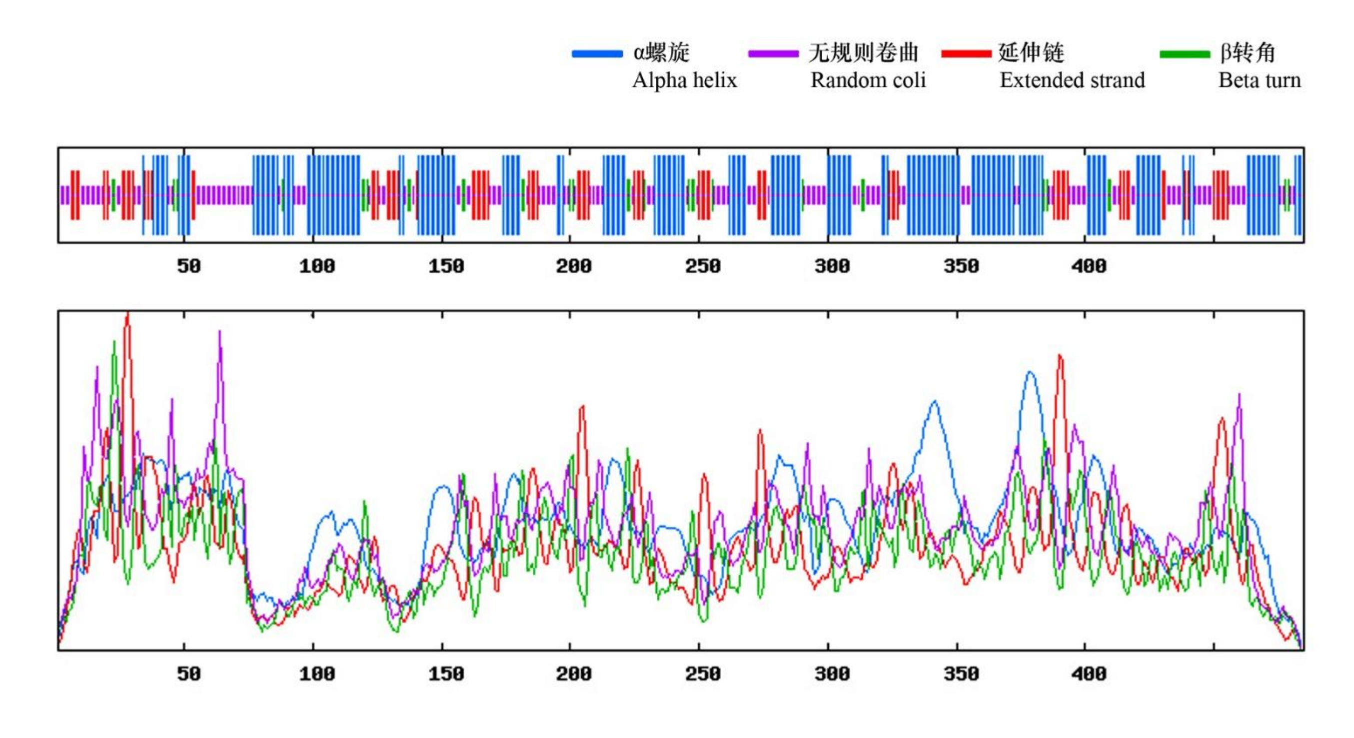


图 5 *PmHDR* 编码蛋白二级结构预测

Fig.5 Prediction of secondary structure of protein encoded by *PmHDR* gene

2.2.7 蛋白三级结构预测

采用同源建模法进行 *PmHDR* 编码蛋白的三级结构预测（图 6），结果显示 *PmHDR* 编码蛋白与同源模板 c3dnfB[1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶]的序列相似度为 33%，置信度为 100%。

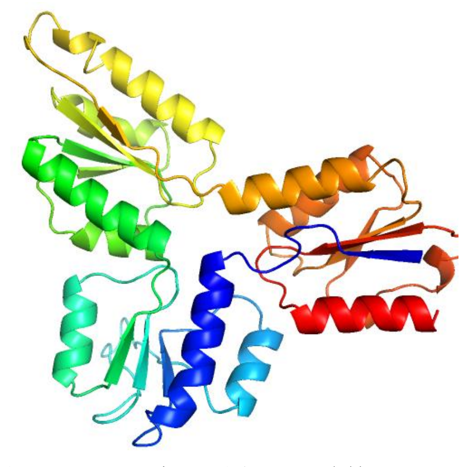


图 6 *PmHDR* 编码蛋白三级结构预测

Fig.6 Prediction of tertiary structure of protein encoded by *PmHDR* gene

2.2.8 系统进化树的构建

通过邻接法（neighbor-joining）将 *PmHDR* 氨基酸序列与其他物种进行比对并构建进化树（图 7），从图 7 可以看出，*PmHDR* 与裸子植物聚在一支，与赤松、火炬松同源性更高。

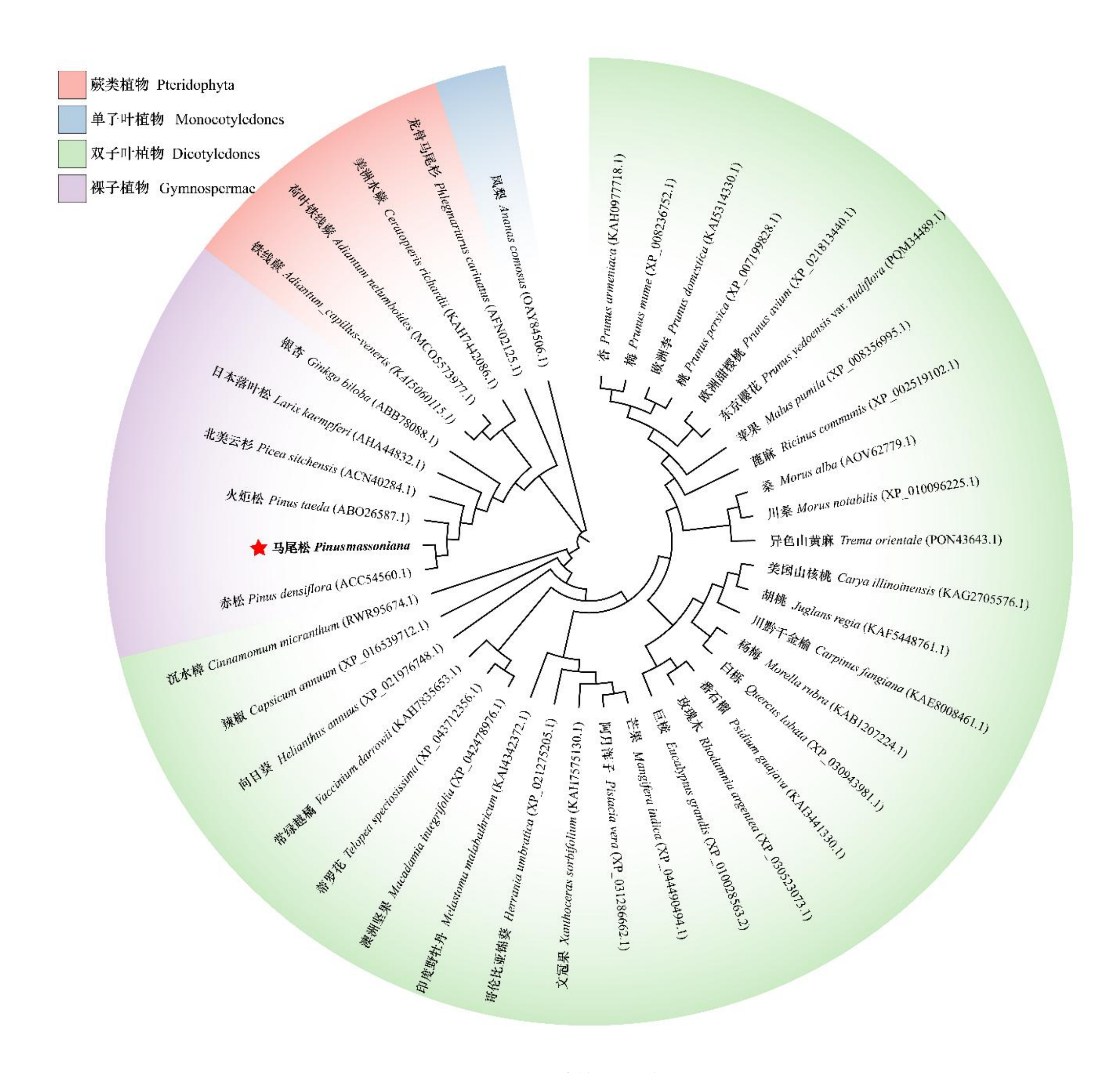


图 7 *PmHDR* 系统进化树

Fig.7 Phylogenetic tree of *PmHDR*

2.3 *PmHDR* 密码子偏好性分析

2.3.1 GC、GC3s、ENC、CAI 和 FOP 分析

使用 CodonW 1.4.2 对 *PmHDR* 的 A3s、U3s、C3s、G3s、ENC、CAI、FOP 等参数进行分析，结果分别为 0.400、0.468、0.272、0.155、47.77、0.215 和 0.363。其中 ENC 常用于分析基因的密码子使用偏好，其值范围为 20~61，ENC 值越小表示基因密码子偏好性越强，一般认为 ENC 值小于 35 表示基因密码子使用偏好性显著（Mensah et al., 2019）。*PmHDR* 基因的 ENC 值为 47.77，说明 *PmHDR* 基因的密码子选择偏好性较弱。CAI 为编码该蛋白的所有密码子相对于这条基因都使用最优密码子的情况下的适应系数，FOP 为最优密码子和其同义密码子的比值，二者值介于 0~1，其值越高，表示密码子偏好性越强，基因表达水平越高。*PmHDR* 基因的 CAI 为 0.215，FOP 为 0.363，均更趋近于 0，进一步说明 *PmHDR* 基因对密码子的选择偏好性弱，表达水平较低。此外，使用 EMBOSS 中的 CUSP 在线软件计算总 GC 含量和 GC3s，结果显示 *PmHDR* 基因编码氨基酸时密码子 GC 含量和 GC3s 值分别为 39.92%和 34.77%，说明密码子偏好以 A/U 结尾。

2.3.2 相对同义密码子使用度分析

在 *PmHDR* 基因选择的密码子中，有 28 个密码子的 RSCU 值大于 1.0，为 *PmHDR* 偏好密码子（表

2），CCA、AGA、GGA、ACU 和 CUU 等 5 个密码子 RSCU 值大于 2.0，偏好性较强，其中编码精氨酸（Arg）的 AGA 密码子 RSCU 值为 2.70，偏好性极强。编码脯氨酸（Pro）的 CCC、CCG 和编码 Arg 的 CGG 密码子的 RSCU 值为 0，说明它们可能不参与 *PmHDR* 基因的翻译过程。*PmHDR* 基因偏好密码子中绝大多数 G/C 结尾的密码子 RSCU 值较低，也进一步表明 *PmHDR* 基因的密码子偏好以 A/U 结尾，表达水平较低。

表 2 *PmHDR* 相对同义密码子使用度

Table 2 RSCU of *PmHDR* gene

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	RSCU	个数 Number	频率 Frequency	比例 Fraction	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	RSCU	个数 Number	频率 Frequency	比例 Fraction
丙氨酸 Ala	GCA	1.87	14	28.807	0.467	脯氨酸 Pro	CCA	2.25	9	18.519	0.562
	GCC	0.53	4	8.230	0.133		CCC	0.00	0	0.000	0.000
	GCG	0.27	2	4.115	0.067		CCG	0.00	0	0.000	0.000
	GCU	1.33	10	20.576	0.333		CCU	1.75	7	14.403	0.438
半胱氨酸 Cys	UGC	0.86	3	6.173	0.429	谷氨酰胺 Gln	CAA	0.93	7	14.403	0.467
	UGU	1.14	4	8.230	0.571		CAG	1.07	8	16.461	0.533
天冬氨酸 Asp	GAC	0.37	5	10.288	0.185	精氨酸 Arg	AGA	2.70	9	18.519	0.450
	GAU	1.63	22	45.267	0.815		AGG	1.80	6	12.346	0.300
谷氨酸 Glu	GAA	1.27	28	57.613	0.636		CGA	0.30	1	2.058	0.050
	GAG	0.73	16	32.922	0.364		CGC	0.60	2	4.115	0.100
苯丙氨酸 Phe	UUC	0.44	4	8.230	0.222		CGG	0.00	0	0.000	0.000
	UUU	1.56	14	28.807	0.778		CGU	0.60	2	4.115	0.100
甘氨酸 Gly	GGA	2.06	16	32.922	0.516	丝氨酸 Ser	AGC	1.16	6	12.346	0.194
	GGC	0.13	1	2.058	0.032		AGU	1.74	9	18.519	0.290
	GGG	0.65	5	10.288	0.161		UCA	1.94	10	20.576	0.323
	GGU	1.16	9	18.519	0.290		UCC	0.39	2	4.115	0.065
组氨酸 His	CAC	0.67	3	6.173	0.333		UCG	0.19	1	2.058	0.032
	CAU	1.33	6	12.346	0.667		UCU	0.58	3	6.173	0.097
异亮氨酸 Ile	AUA	0.75	8	16.461	0.250	苏氨酸 Thr	ACA	1.11	10	20.576	0.278
	AUC	0.56	6	12.346	0.188		ACC	0.22	2	4.115	0.056
	AUU	1.69	18	37.037	0.562		ACG	0.56	5	10.288	0.139
甲硫氨酸 Met	AUG	1.00	12	24.691	1.000		ACU	2.11	19	39.095	0.528
赖氨酸 Lys	AAA	1.02	23	47.325	0.511	色氨酸 Trp	UGG	1.00	8	16.461	1.000
	AAG	0.98	22	45.267	0.489	缬氨酸 Val	GUA	1.03	9	18.519	0.257
亮氨酸 Leu	CUA	0.34	2	4.115	0.057		GUC	0.23	2	4.115	0.057
	CUC	0.51	3	6.173	0.086		GUG	1.26	11	22.634	0.314
	CUG	0.86	5	10.288	0.143		GUU	1.49	13	26.749	0.371
	CUU	2.06	12	24.691	0.343	酪氨酸 Tyr	UAC	0.55	3	6.173	0.273
	UUA	0.34	2	4.115	0.057		UAU	1.45	8	16.461	0.727
	UUG	1.89	11	22.634	0.314	*	UAA	0.00	0	0.000	0.000
天冬酰胺 Asn	AAC	0.87	10	20.576	0.435		UAG	1.00	1	2.058	1.000
	AAU	1.13	13	26.749	0.565		UGA	0.00	0	0.000	0.000

注：下划线表示该密码子 RSCU>1，*表示终止密码子。

Note: The underline indicates that the value of RSCU>1, * indicates the stop codon.

2.3.3 *PmHDR* 外源宿主的选择

将 *PmHDR* 基因的密码子使用频率分别与拟南芥、烟草、酿酒酵母和大肠杆菌等模式物种的基因组进行比较分析（表 3），将比值大于等于 2.0 和小于等于 0.5 作为筛选密码子偏好性差异较大的标准，以此统计差异个数。与 2 种模式植物的基因组相比，*PmHDR* 基因的绝大部分密码子使用偏好性差异较小，与拟南芥和烟草基因组密码子的使用频率差异较大的分别有 16 和 14 个，说明在进行 *PmHDR* 遗传转化试验时，烟草和拟南芥均可作为异源表达的受体。与 2 种微生物的基因组相比，*PmHDR* 与大肠杆菌密码子偏好性差异很大，使用频率差异较大的密码子有 24 个，而与酿酒酵母相比使用频率差异较大的密码子只有 14 个，密码子偏好性差异显著小于大肠杆菌，说明酿酒酵母更适合作为 *PmHDR* 微生物内异源表达试验的受体。

表 3 *PmHDR* 与部分模式物种基因组密码子使用偏好性比较

Table 3 Comparison of codon usage preference between *PmHDR* and other model organisms

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	*PmHDR*	拟南芥基因组 *Arabidopsis thaliana*（At）	烟草基因组 *Nicotiana tabacum*（Nt）	酿酒酵母基因组 *Saccharomyces cerevisiae*（Sc）	大肠杆菌基因组 *Escherichia coli*（Ec）	*PmHDR* /At	*PmHDR* /Nt	*PmHDR* /Sc	*PmHDR* /Ec
苯丙氨酸	UUU	28.81	21.80	25.10	26.10	22.20	1.32	1.15	1.10	1.30
Phe	UUC	8.23	20.70	18.00	18.40	15.90	0.40	0.46	0.45	0.52
亮氨酸	UUA	4.12	12.70	13.40	26.20	13.80	0.32	0.31	0.16	0.30
Leu	UUG	22.63	20.90	22.30	27.20	13.00	1.08	1.01	0.83	1.74
	CUU	24.69	24.10	24.00	12.30	11.40	1.02	1.03	2.01	2.17
	CUC	6.17	16.10	12.30	5.40	10.50	0.38	0.50	1.14	0.59
	CUA	4.12	9.90	9.40	13.40	3.90	0.42	0.44	0.31	1.06
	CUG	10.29	9.80	10.20	10.50	51.10	1.05	1.01	0.98	0.20
异亮氨酸	AUU	37.04	21.50	27.80	30.10	29.70	1.72	1.33	1.23	1.25
Ile	AUC	12.35	18.50	13.90	17.20	23.90	0.67	0.89	0.72	0.52
	AUA	16.46	12.60	14.00	17.80	5.50	1.31	1.18	0.92	2.99
甲硫氨酸 Met	AUG	24.69	24.50	25.00	20.90	27.20	1.01	0.99	1.18	0.91
谷氨酰胺	CAA	14.40	19.40	20.70	27.30	14.70	0.74	0.70	0.53	0.98
Gln	CAG	16.46	15.20	15.00	12.10	29.40	1.08	1.10	1.36	0.56
色氨酸 Trp	UGG	16.46	12.50	12.20	10.40	15.30	1.32	1.35	1.58	1.08
缬氨酸	GUU	26.75	27.20	26.80	22.10	18.10	0.98	1.00	1.21	1.48
Val	GUC	4.12	12.80	11.10	11.80	14.80	0.32	0.37	0.35	0.28
	GUA	18.52	9.90	11.40	11.80	10.90	1.87	1.62	1.57	1.70
	GUG	22.63	17.40	16.70	10.80	26.20	1.30	1.36	2.10	0.86
丝氨酸	AGU	18.52	14.00	13.30	14.20	9.40	1.32	1.39	1.30	1.97
Ser	AGC	12.35	11.30	10.00	9.80	16.00	1.09	1.23	1.26	0.77
	UCU	6.17	25.20	20.00	23.50	8.70	0.24	0.31	0.26	0.71
	UCC	4.12	11.20	10.20	14.20	8.90	0.37	0.40	0.29	0.46
	UCA	20.58	18.30	17.60	18.70	8.10	1.12	1.17	1.10	2.54
	UCG	2.06	9.30	5.30	8.60	8.80	0.22	0.39	0.24	0.23
脯氨酸	CCU	14.40	18.70	18.70	13.50	7.20	0.77	0.77	1.07	2.00
Pro	CCC	0.00	5.30	6.60	6.80	5.60	0.00	0.00	0.00	0.00
	CCA	18.52	16.10	19.80	18.30	8.40	1.15	0.94	1.01	2.20
	CCG	0.00	8.60	5.00	5.30	22.40	0.00	0.00	0.00	0.00
苏氨酸	ACU	39.10	17.50	20.30	20.30	9.10	2.23	1.93	1.93	4.30
Thr	ACC	4.12	10.30	9.70	12.70	22.80	0.40	0.42	0.32	0.18
	ACA	20.58	15.70	17.40	17.80	8.10	1.31	1.18	1.16	2.54
	ACG	10.29	7.70	4.50	8.00	15.00	1.34	2.29	1.29	0.69
丙氨酸	GCU	20.58	28.30	31.20	21.20	15.40	0.73	0.66	0.97	1.34
Ala	GCC	8.23	10.30	12.50	12.60	25.20	0.80	0.66	0.65	0.33
	GCA	28.81	17.50	23.10	16.20	20.70	1.65	1.25	1.78	1.39
	GCG	4.12	9.00	5.80	6.20	32.30	0.46	0.71	0.66	0.13
酪氨酸	UAU	16.46	14.60	17.80	18.80	16.50	1.13	0.92	0.88	1.00
Tyr	UAC	6.17	13.70	13.50	14.80	12.30	0.45	0.46	0.42	0.50
组氨酸	CAU	12.35	13.80	13.40	13.60	12.80	0.89	0.92	0.91	0.96
His	CAC	6.17	8.70	8.70	7.80	9.40	0.71	0.71	0.79	0.66
天冬酰胺	AAU	26.75	22.30	28.00	35.70	19.20	1.20	0.96	0.75	1.39
Asn	AAC	20.58	20.90	17.90	24.80	21.70	0.98	1.15	0.83	0.95
赖氨酸	AAA	47.33	30.80	32.60	41.90	34.00	1.54	1.45	1.13	1.39
Lys	AAG	45.27	32.70	33.50	30.80	11.00	1.38	1.35	1.47	4.12
天冬氨酸	GAU	45.27	36.60	36.90	37.60	32.80	1.24	1.23	1.20	1.38
Asp	GAC	10.29	17.20	16.90	20.20	19.20	0.60	0.61	0.51	0.54
谷氨酸	GAA	57.61	34.30	36.00	45.60	39.30	1.68	1.60	1.26	1.47
Glu	GAG	32.92	32.20	29.40	19.20	18.70	1.02	1.12	1.71	1.76
半胱氨酸	UGU	8.23	10.50	9.80	8.10	5.20	0.78	0.84	1.02	1.58
Cys	UGC	6.17	7.20	7.20	4.80	6.40	0.86	0.86	1.29	0.96
甘氨酸	GGU	18.52	22.20	22.30	23.90	24.20	0.83	0.83	0.77	0.77
Gly	GGC	2.06	9.20	11.20	9.80	28.10	0.22	0.18	0.21	0.07
	GGA	32.92	24.20	23.20	10.90	8.90	1.36	1.42	3.02	3.70
	GGG	10.29	10.20	10.50	6.00	11.80	1.01	0.98	1.71	0.87
精氨酸	CGU	4.12	9.00	7.50	6.40	20.20	0.46	0.55	0.64	0.20
Arg	CGC	4.12	3.80	3.90	2.60	20.80	1.08	1.06	1.58	0.20

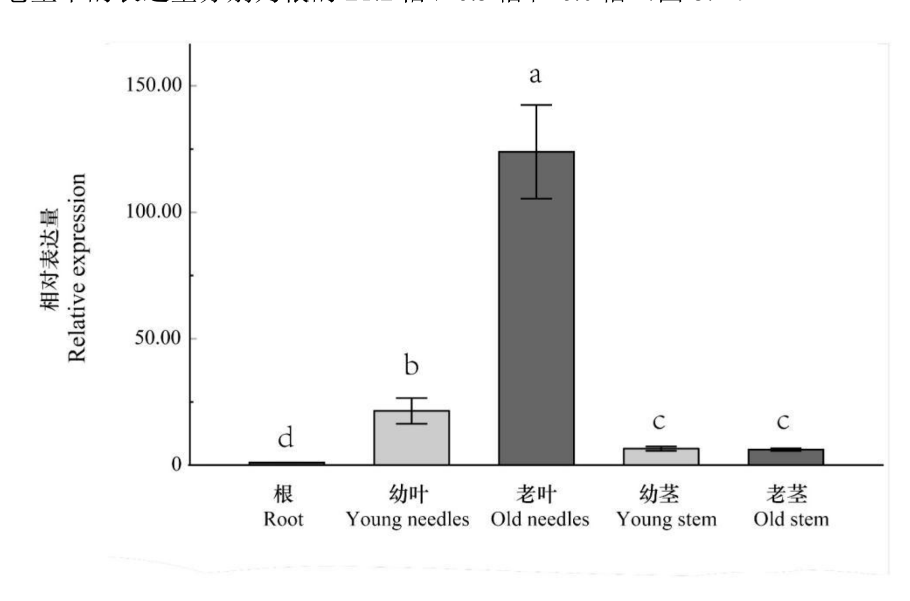
氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	*PmHDR*	拟南芥基因组 *Arabidopsis thaliana*（At）	烟草基因组 *Nicotiana tabacum*（Nt）	酿酒酵母基因组 *Saccharomyces cerevisiae*（Sc）	大肠杆菌基因组 *Escherichia coli*（Ec）	*PmHDR* /At	*PmHDR* /Nt	*PmHDR* /Sc	*PmHDR* /Ec
	CGA	2.06	6.30	5.30	3.00	3.80	<u>0.33</u>	<u>0.39</u>	0.69	0.54
	CGG	0.00	4.90	3.70	1.70	6.20	0.00	0.00	0.00	0.00
	AGA	18.52	19.00	16.00	21.30	2.90	0.97	1.16	0.87	<u>6.39</u>
	AGG	12.35	11.00	12.20	9.20	1.80	1.12	1.01	1.34	<u>6.86</u>
*	UAA	0.00	0.90	1.10	1.10	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	UAG	2.06	0.50	0.50	0.50	0.30	<u>4.12</u>	<u>4.12</u>	<u>4.12</u>	<u>6.86</u>
	UGA	0.00	1.20	1.00	0.70	1.10	0.00	0.00	0.00	0.00

注：下划线表示密码子使用频率差异较大，*表示终止密码子。

Note: The underline indicates that the codon usage frequency is quite different, and * indicates the stop codon.

2.4 *PmHDR* 的组织特异性表达分析

通过实时荧光定量表达技术，分析 *PmHDR* 基因在成年马尾松根、幼叶、老叶、幼茎、老茎中的表达情况。结果表明，*PmHDR* 基因在马尾松根中表达量最低，在老叶中表达量最高，为根中表达量的 122.2 倍，在幼叶、幼茎、老茎中的表达量分别为根的 21.2 倍、6.5 倍和 6.0 倍（图 8）。



不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

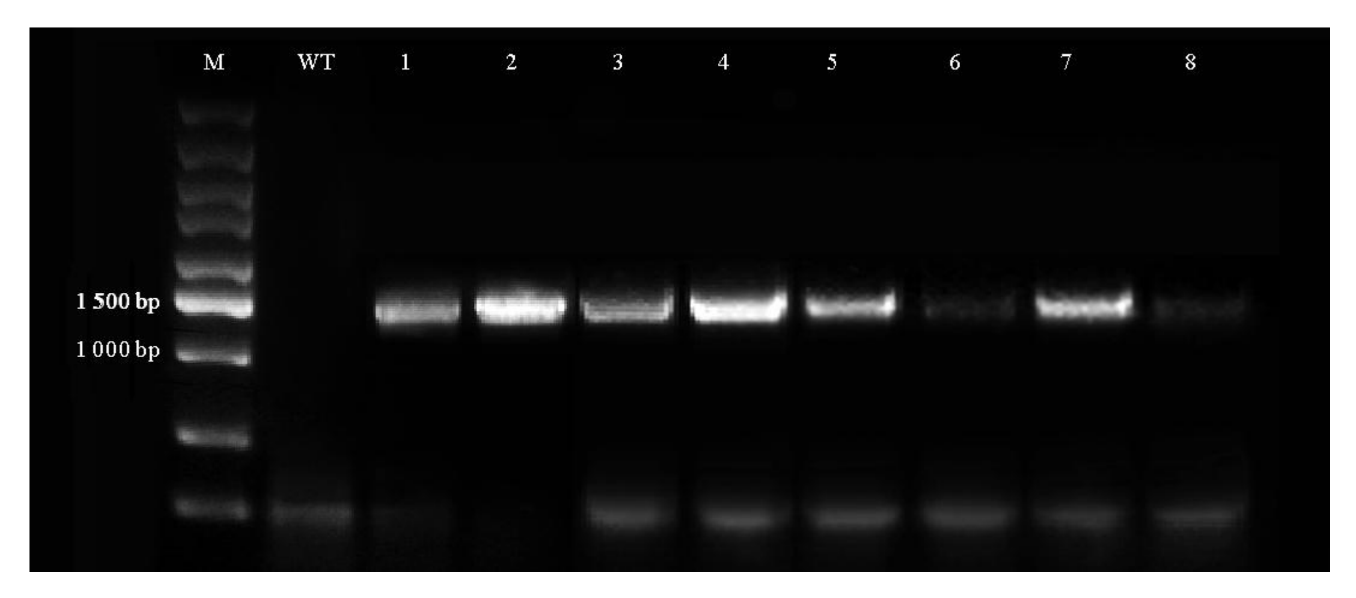
Different lowercase letters indicate significant differences (P<0.05).

图 8 *PmHDR* 基因的组织特异性表达

Fig.8 Tissue specific expression of *PmHDR* gene

2.5 胁迫处理下拟南芥生长观测

将转基因拟南芥种子播种在含 Kana 抗生素的 MS 固体培养基上进行筛选，并选取其中正常生长发育的植株幼苗转移至营养土中继续培养 2~3 周后进行分子鉴定（图 9）。结果显示，被选择的 8 株转基因拟南芥中有 6 株检测结果为阳性，因此采集这 6 株拟南芥的种子，开展后续实验。



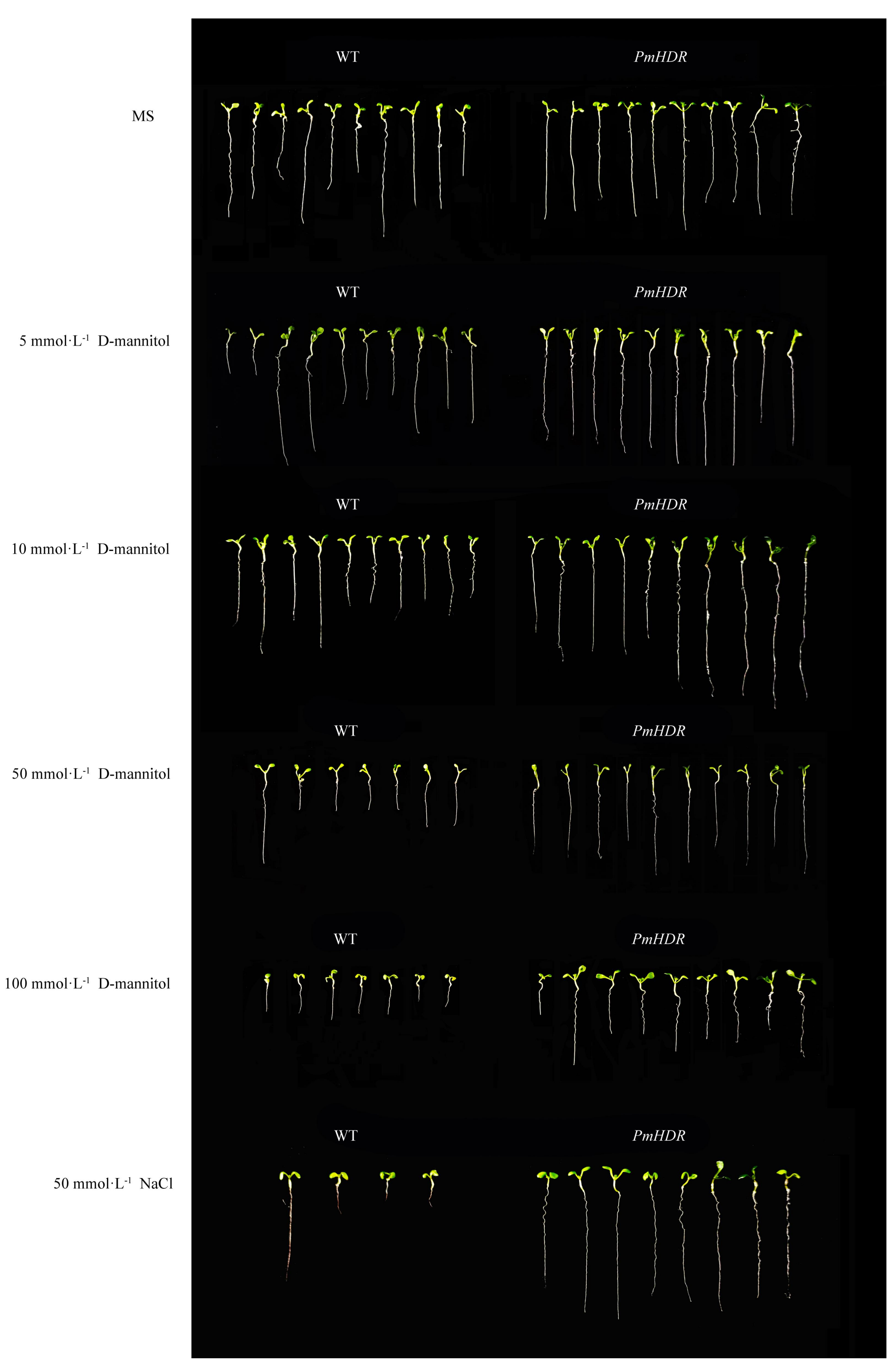
WT 为野生型拟南芥；1-8 为转基因拟南芥。

WT is wild *Arabidopsis thaliana*; 1-8 is transgenic *Arabidopsis thaliana*.

图 9 转基因拟南芥 PCR 检测

Fig. 9 PCR detection of transgenic Arabidopsis thaliana

利用 D-甘露醇和 NaCl 分别对拟南芥进行干旱胁迫和盐胁迫处理，将野生型和 *PmHDR* 转基因拟南芥种子分别点播在含有不同浓度 D-甘露醇和 NaCl 的 MS 固体培养基上培养 10 d，观察并记录各个培养基中拟南芥的生长发育情况（图 10）。结果表明，在正常培养条件（无胁迫处理）下，转基因拟南芥的胚根长略高于野生型拟南芥，但差异不显著；与之相比，经 5、10、50、100 mmol·L^{-1} D-甘露醇和 50 mmol·L^{-1} NaCl 处理的拟南芥生长受到不同程度的抑制，其中野生型拟南芥平均胚根长分别降低 35.49%、39.26%、53.59%、77.08%、77.06%，转基因拟南芥平均胚根长分别降低 11.03%、7.40%、21.88%、59.09%、20.10%。在 D-甘露醇和 NaCl 胁迫处理下，转基因拟南芥的胚根长显著高于野生型拟南芥，说明转基因拟南芥受 D-甘露醇和 NaCl 胁迫影响小，对干旱和盐胁迫表现出更强的抗逆性（图 11）。

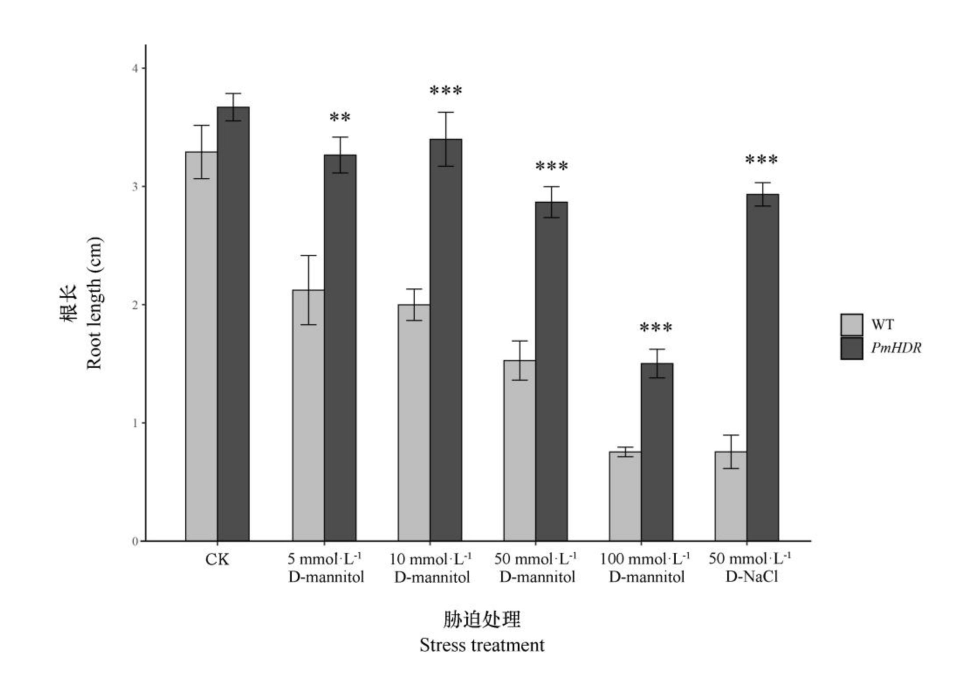


WT 为野生型拟南芥；*PmHDR* 为转基因拟南芥。下同。

WT is wild *Arabidopsis thaliana*; *PmHDR* is transgenic *Arabidopsis thaliana*. The same below.

图 10 不同处理拟南芥生长状况

Fig.10 Growth of *Arabidopsis thaliana* in different treatments



表示 P<0.01，*表示 P<0.001。

** indicates P<0.01, *** indicates P<0.001.

图 11 不同处理拟南芥胚根长

Fig.11 Root length of *Arabidopsis thaliana* radicle in different treatments

3 讨论与结论

萜类化合物是植物次生代谢产物中最丰富、结构最多样化的一类，在植物生长发育和抵抗逆境胁迫的过程中到重要作用。1-羟基-2-甲基-2-E-丁烯基-4-焦磷酸还原酶（HDR）是萜类化合物合成中 MEP 途径的末端活性酶，具有提供前体萜类物质和主要限速作用。为探究马尾松对干旱和盐胁迫的响应，本文研究克隆了 *PmHDR* 基因。而萜类化合物生物合成 MEP 途径上游关键酶的编码基因 *PmDXS* 和 *PmDXR* 已被成功克隆和分析，发现二者均在一定程度上参与马尾松对非生物胁迫的响应（李荣，2021；朱灵芝，2021）。

PmHDR 蛋白可能在一定程度上促进马尾松的生长发育和逆境响应过程。本文研究发现 *PmHDR* 基因长度为 1 458 bp，编码 485 个氨基酸，其编码蛋白包含 LytB/IspH 基因超家族的核心序列和 PLN02821 多功能结构域，属于 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶家族，这说明 PmHDR 蛋白参与催化萜类化合物的生物合成。对 PmHDR 蛋白进行结构预测，发现该蛋白富含α螺旋与β折叠，三级结构呈“苜蓿叶”形，与其他物种中的 HDR 蛋白结构相似；4 个保守的半胱氨酸残基可能处于“苜蓿叶”中间位置，构成铁硫建形成酶的催化中心，从而参与维持细胞内的氧化还原反应（刘苗苗等，2017）。

研究不同植物 *HDR* 基因表达和功能时，需要根据物种特性及其主要萜类化合物的类型和功能，有针对性地进行分析和验证。本研究结果发现 *PmHDR* 基因在马尾松各个组织中均有表达，但在老叶中表达量明显高于其他部位，其次为幼叶、幼茎和老茎，在根中表达量最低，这与铁皮石斛（吴秋菊等，2015）和甘薯（*Dioscorea esculenta*）（Wang et al., 2012）中 *HDR* 的表达特征较为相似。然而在萝芙木（Chen et al., 2010）中，*HDR* 基因在花中表达量最高，果实次之；在秦艽（*Gentiana macrophylla*）（岑文等，2015）中，HDR 基因在花中表达水平显著高于其他组织，而在根、茎、叶中表达差异不显著；在银杏（Lu et al., 2008）和橡胶（Sando et al., 2008）中，*HDR* 基因在根中表达量则显著高于茎和叶。这说明 *HDR* 基因在不同植物中的表达模式和表达量存在较大的差异，这可能是因为在不同植物中，次生代谢所产生的萜类化合物类型和数量不同，进而导致其功能和应用的差异，因此对于不同物种中 *HDR* 等萜类化合物生物合成上游关键基因的研究目的也各不相同。如对于秦艽（岑文等，2015）、艾叶（刘苗苗等，2017）、丹参（Chen et al.,

2013）等药用植物来说，萜类及萜类衍生物是其重要的有效药用成分；对于葡萄（*Vitis vinifera*）（Chen et al., 2023）来说，萜烯类物质是葡萄香气的主要贡献者，而香气是衡量葡萄品质的重要指标。

对密码子偏好性进行分析，不仅有助于基因功能、蛋白表达的研究，亦有助于选择合适的宿主，提高外源基因表达效率（吴宪明等，2007）。本研究对马尾松 *PmHDR* 基因的密码子偏好模式进行了系统分析，发现 *PmHDR* 基因在编码蛋白时对 CCA、AGA、GGA、ACU 和 CUU 等 5 个密码子的偏好性极强，而编码脯氨酸的 CCC、CCG 和编码 Arg 的 CGG 密码子可能不参与 *PmHDR* 基因的翻译过程。ENC、CAI、FOP 等多个参数显示，*PmHDR* 基因对密码子的选择偏好性弱，这可能导致其编码蛋白表达水平较低。*PmHDR* 基因中密码子的 GC 和 GC3s 含量分别为 39.92%和 34.77%，说明其密码子偏好以 A/T 结尾，这一结果符合马尾松总体上偏好使用第 3 位为 A/T 碱基的密码子的特征（Zhu et al., 2020）。

由于马尾松同源转化平台的搭建存在难度，至今未完成搭建，目前的功能基因分析只能暂时借助异源转化。本研究将 *PmHDR* 基因的密码子使用频率分别与拟南芥、烟草、酿酒酵母和大肠杆菌等模式物种的基因组进行比较分析，发现相比于大肠杆菌原核表达系统，酵母真核表达系统更适合作为 *PmHDR* 基因的表达系统，而在 *PmHDR* 遗传转化功能验证中，拟南芥和烟草均可作为其遗传转化受体，这一结果与在 *PmDXR* 基因中的研究一致（Zhu et al., 2021）。因此在进行 *PmHDR* 基因功能验证时，本研究使用了拟南芥作为其遗传转化受体，通过对比转基因拟南芥和野生型拟南芥在干旱和盐胁迫条件下的表型差异，探究该基因的功能。

在正常生理条件下，转基因拟南芥生长状况略好于野生型拟南芥，但差异并不显著。在干旱和盐胁迫处理条件下，转基因拟南芥生长受抑制情况显著弱于野生型拟南芥，表现出更强的抗逆性，这与其上游基因 *PmDXS*（李荣，2021）和 *PmDXR*（朱灵芝，2021）的研究相似。前人研究已经发现，在萝芙木（Chen et al., 2010）和铁皮石斛（吴秋菊等，2015）中，*HDR* 基因的表达均受 ABA 的调控。作为一种胁迫激素，ABA 在植物抗逆过程中起着重要作用，广泛地参与到植物抗寒、抗旱、耐盐等多个胁迫响应过程。ABA 的生物合成主要有类萜途径、类胡萝卜素途径两条途径，在高等植物中以类胡萝卜素途径为主（Yoshida et al., 2020），而类胡萝卜素是萜类合成 MEP 途径的下游通路，因此 *PmHDR* 基因对干旱和盐胁迫的响应很可能与 ABA 有关，且可能存在反馈调节。这一结果可以为马尾松抗旱和抗盐碱的分子育种提供候选基因和参考，但 *PmHDR* 基因调控干旱和盐胁迫响应的具体调节机制还需要进一步研究。

参考文献：

BOTELLA-PAVIA P, BESUMBES O, PHILLIPS M A, et al., 2004. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors[J]. Plant J, 40(2): 188-199.

CEN W, KONG WW, ZHENG P, et al., 2015. Cloning and expression analysis of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase gene(*GmHDR*) from *Gentiana macrophylla*[J]. Guihaia, 35(5): 755-760. [岑文，孔维维，郑鹏，等，2015. 秦艽 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶基因(*GmHDR*)的克隆和表达分析[J]. 广西植物，35(5)：755-760.]

CHEN J, LIU W, MIN C, et al., 2010. The *HDR* gene involved in the TIA pathway from *Rauvolfia verticillata*: Cloning, characterization and functional identification[J]. J Med Plants Res, 4(10): 915-924.

CHEN XM, 2018. Exploration and expression of lipid-producing genes in *Pinus massoniana*[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry. [陈晓明，2018. 马尾松产脂相关基因挖掘及表达规律研究[D]. 北京：中国林业科学研究院.]

CHEN TC, ZHANG Q, WANG JY, et al., 2023. Cloning and bioinformatics analysis of *HDR* gene from ‘Yinhong’ grape[J]. Mol Plant Breed, 21(2): 409-419. [陈天池，张巧，王锦阳，等，2023. ‘鄞红’葡萄 *HDR* 基因的克隆与生物信息学分析[J]. 分子植物育种，21(2)：409-419.]

CHENG QQ, HE YF, LI G, et al., 2013. Cloning and induced expression analysis of 4-hydroxy-3-methyl-but2-enyl diphosphate reductase gene (*SmHDR*) of *Salvia miltiorrhiza*[J]. Acta Pharm Sin B, 48(2): 236-242. [程琪庆，

何云飞，李耿，等，2013. 丹参 4-羟基-3-甲基-2-丁烯基焦磷酸还原酶基因的全长克隆与诱导表达分析[J]. 药学学报，48(2)：236-242.]

CUNNINGHAM F X, LAFOND T P, GANTT E, 2000. Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis[J]. J Bacteriol, 182(20):5841-5848.

EISENREICH W, ROHDICH F, BACHER A, 2001. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids[J]. Trends Plant Sci, 6(2): 78-84.

HAO QQ, YAO S, LIU JH, et al., 2022. Cloning and expression analysis of NAC transcription factor *PmNAC8* in *Pinus massoniana*[J]. Biotechnol Bull, 38(4): 202-216. [镐青青，姚圣，刘佳禾，等，2022. 马尾松 NAC 转录因子基因 *PmNAC8* 的克隆及表达分析[J]. 生物技术通报，38(4)：202-216.]

HUANG J, CHENG T, WEN P, et al., 2009. Molecular characterization of the *Oncidium orchid HDR* gene encoding 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase, the last step of the methylerythritol phosphate pathway[J]. Plant Cell Rep, 28(10): 1475-1486.

LAOTHAWORNKITKUL J, PAUL ND, VICKERS CE, et al., 2008. Isoprene emissions influence herbivore feeding decisions[J]. Plant Cell Environ, 31(10): 1410-1415.

LI AM, QUAN MH, NIU YY, et al., 2008. Research progress on factors affecting the yield of *Pinus massoniana* turpentine[J]. Hunan Fore Sci Technol, 35(1): 58-59. [李爱民，全妙华，牛友芽，等，2008. 马尾松松脂产量影响因素研究进展[J]. 湖南林业科技，35(1)：58-59.]

LI R, 2021. Cloning and Functional Identification of *PmDXS* Gene of *Pinus massoniana* Lamb[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University. [李荣，2021. 马尾松 *PmDXS* 基因克隆及功能鉴定[D]. 南京：南京林业大学.]

LIU MM, WU JW, WU SB, et al., 2017. Cloning and characterization of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase (*ArHDR*) Gene in *Artemisia argyi*[J]. Chin Med Mat, 40(8): 1793-1797. [刘苗苗，吴家文，吴生兵，等，2017. 艾叶 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶基因的克隆及蛋白的结构性质分析[J]. 中药材，40(8)：1793-1797.]

LU J, WU WS, CAO SW, et al., 2008. Molecular cloning and characterization of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase gene from *Ginkgo biloba*[J]. Mol Biol Rep, 35(3): 413-420.

LUO YM, LIU AH, LI Q, et al., 2003. Advances in biosynthesis of plant terpenoids and their key enzymes[J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med, 15(1): 45-51. [罗永明，刘爱华，李琴，等，2003. 植物萜类化合物的生物合成途径及其关键酶的研究进展[J]. 江西中医学院学报，15(1)：45-51.]

MENSAH R, SUN X, CHENG C, et al., 2019. Analysis of codon usage pattern of banana basic secretory protease gene[J]. Plant Dis Pest, 10(1): 1-4.

NISAR N, LI L, SHAN L, et al., 2015. Carotenoid metabolism in plants[J]. Mol Plant, 8(1): 68-82.

OBATA T, FERNIE A, 2012. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses[J]. CMLS, 69(19): 3225-3243.

PENG M, CHEN M, CHEN R, et al., 2011. The last gene involved in the MEP pathway of *Artemisia annua*: Cloning and characterization and functional identification[J]. J Med Plants Res, 5(2): 223-230.

PICHLER P, OBERHUBER W, 2007. Radial growth response of coniferous forest trees in an inner alpine environment to heat-wave in 2003[J]. For Ecol Manag, 242(2-3): 688-699.

QUAN WX, DING GJ, 2017. Dynamic of volatiles and endogenous hormones in *Pinus massoniana* needles under drought stress[J]. Sci Silv Sin, 53(4): 49-55. [全文选，丁贵杰，2017. 干旱胁迫下马尾松幼苗针叶挥发性物质与内源激素的变化[J]. 林业科学，53(4)：49-55.]

RASTOGI S, SHAH S, KUMAR R, et al., 2019. Ocimum metabolomics inresponse to abiotic stresses: cold, flood, drought and salinity[J]. PLoS ONE, 14(2): e0210903.

ROHMER M, 1999. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants[J]. Nat Prod Rep, 5(16): 565-574.

SANDO T, TAKENO S, WATANABE N, et al., 2008. Cloning and characterization of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway genes of a natural-rubber producing plant, *Hevea brasiliensis*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 72(11): 2903-2917.

SUN LC, LI SY, WANG FZ, et al., 2017. Research progresses in the synthetic biology of terpenoids[J]. Biotechnol Bull, 33(1):64-75. [孙丽超，李淑英，王凤忠，等，2017. 萜类化合物的合成生物学研究进展[J]. 生物技术通报，33(1)：64-75.]

SUN Y, CHEN M, TANG J, et al., 2009. The 1-hydroxy-2-methyl-butenyl 4-diphosphate reductase gene from *Taxus media*: cloning, characterization and functional identification[J]. Afr J Biotechnol, 8(18): 4339-4346.

WANG G, CHEN M, LIU X, et al., 2012. Molecular cloning and characterization of the *HDR* gene involved in the methyl-erythritol phosphate (MEP) pathway from sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam][J]. Afr J Agric Res, 7(2): 205-211.

WANG Q, PI Y, HOU R, et al., 2008. Molecular cloning and characterization of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase (*CaHDR*) from *Camptotheca acuminata* and its functional identification in *Escherichia coli*[J]. Bmb Rep, 41(2): 112-118.

WANG Y, LIU ZY, LÜ Q, et al., 2014. Cloning and sequence analysis of α-pinene synthase gene from *Pinus massoniana*[J]. Anhui J Agric Sci, 42(13): 3808-3811. [王颖，刘振宇，吕全，等，2014. 马尾松α-蒎烯合成酶基因 cDNA 全长克隆及序列分析[J]. 安徽农业科学，42(13)：3808-3811.]

WANG Y, ZHOU X, WEI B, et al., 2015. Cloning and sequence analysis of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase gene cDNA from *Pinus kesiya* var. *langbianensis*[J]. Guihaia, 35(5): 721-727. [王毅，周旭，毕玮，等，2015. 思茅松 *HDR* 基因全长 cDNA 克隆与序列分析[J]. 广西植物,35(5): 721-727.]

WU QJ, WU MJ, WANG X, et al., 2015. Cloning and expression analysis of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase gene in *Dendrobium officinale*[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 46(3): 405-411. [吴秋菊，武梅娟，王翔，等，2015. 铁皮石斛 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶基因的克隆与表达分析[J]. 中草药，46(3)：405-411.]

WU XM, WU SF, REN DM, et al., 2007. The analysis method and progress in the study of codon bias[J]. Hereditas, 29(4): 420-426. [吴宪明，吴松锋，任大明，等，2007. 密码子偏性的分析方法及相关研究进展[J]. 遗传，29(4)：420-426.]

XU XH, DING GJ, 2006. Physiological and biochemical responses of *Pinus massoniana* to low phosphorus stress[J]. Sci Silv Sin, 42(9): 24-28. [徐向华，丁贵杰，2006. 马尾松适应低磷胁迫的生理生化响应[J]. 林业科学，42(9)：24-28.]

YAN XF, WANG Y, LI YM, 2007. Plant secondary metabolism and its response to environment[J]. Acta Ecol Sin, 27(6): 2554-2562. [阎秀峰，王洋，李一蒙，2007. 植物次生代谢及其与环境的关系[J]. 生态学报，27(6)：2554-2562.]

YOSHIDA, TAKUYA, CHRISTMANN, et al., 2019. Revisiting the basal role of ABA - roles outside of stress[J]. Trends Plant Sci, 24(7): 625-635.

ZHANG JF, CHEN PZ, SUN XB, et al., 2021. Effects on photosynthetic and resistant physiological characteristics of *Pinus massoniana* seedlings under drought stress[J]. Chin Agric Sci Bull, 37(1): 32-38. [张金凤，陈佩珍，孙晓波，等，2021. 干旱对马尾松幼苗光合作用及相关生理的影响[J]. 中国农学通报，37(1)：32-38.]

ZHANG W, WANG YL, LIN J, et al., 2008. Transformation of *Ginkgo biloba* with 1-hydroxy-2methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase gene[J]. J Fudan Univ(Nat Sci Ed), 47(5): 598-603. [张雯，王玉亮，林娟，等，2008. 银杏 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶基因(hdr)转化银杏的研究[J]. 复旦学报(自然科学版)，47(5)：598-603.]

ZHANG YD, ZENG Y, LU S, 2019. Recent progress in the study of metabolic flux regulation in rice diterpene biosynthesis[J]. Acta Phytophysiol Sin, 55(12): 1762-1768. [张艺丹，曾英，卢山，2019. 水稻二萜合成途

径中代谢流调控机制研究进展[J]. 植物生理学报，55(12)：1762-1768.]

ZHAO L, MA LG, HAN DW, et al., 2016. Cloning and bioinformatic analysis and prokaryotic expression of *LaSPS* gene from *Lepidium apetalum*[J]. Acta Hortic Sin, (6): 92-99. [赵乐，马利刚，韩杜菀，等，2016. 独行菜 *LaSPS* 基因的克隆与生物信息学分析及原核表达[J]. 北方园艺，(6)：92-99.]

ZHU LZ, ZHU PH, LI R, et al., 2021. Analysis on codon bias of *PmDXR* gene in *Pinus massoniana* Lamb[J]. For Res, 34(2): 102-113. [朱灵芝，朱沛煌，李荣，等，2021. 马尾松 *PmDXR* 基因密码子偏好性分析[J]. 林业科学研究，34(2)：102-113.]

ZHU LZ, 2021,Cloning and function analysis of *PmDXR* gene in *Pinus massoniana*[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University. [朱灵芝，2021. 马尾松 *PmDXR* 基因的克隆与功能分析[D]. 南京：南京林业大学.]

ZHU PH, CHEN Y, ZHU LZ, et al., 2020. Codon usage bias and its influencing factors in *Pinus massoniana* transcriptome[J]. Sci Silv Sin, 56(4): 74-81. [朱沛煌，陈妤，朱灵芝，等，2020. 马尾松转录组密码子使用偏好性及其影响因素[J]. 林业科学，56(4)：74-81.]